

喂饲补肾中药大鼠的血清对成骨细胞的生物学作用

唐井钢,李娟,吴贺勇(南方医科大学南方医院中医科,广东广州 510515)

摘要:目的 探讨喂饲补肾中药大鼠的血清对体外培养的成骨细胞的生物学作用。方法 在新生 SD 大鼠颅骨第 2 代成骨细胞培养液中加入不同浓度(低、中、高)的中药血清,并与空白组对照,分别观察成骨细胞的增殖、分化和矿化功能。结果 补肾中药血清具有刺激成骨细胞增殖的作用,可提高碱性磷酸酶活性并增加矿化结节形成的数量。结论 补肾中药血清具有刺激体外培养的成骨细胞增殖及分化成熟的功能。

关键词:补肾中药;细胞培养;成骨细胞;血清药理学

中图分类号:Q282.74 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)11-1248-03

Biological effect of serum of kidney-tonifying traditional Chinese drug-fed rats on cultured osteoblasts

TANG Jing-gang, LI Juan, WU He-yong

Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the biological effects of the serum of rats fed with kidney-tonifying traditional Chinese drugs on cultured osteoblasts *in vitro*. **Methods** The culture media containing the serum from rats fed with the drugs at different doses (high, mediate and low doses) were used to treat the second passage of the osteoblasts from the skull of newborn SD rats, and the cell proliferation, differentiation and mineralization were observed. **Results** The serum stimulated the cell proliferation, enhanced alkaline phosphatase activity and increased the number of mineralized nodules in the cultured osteoblasts. **Conclusion** Kidney-tonifying traditional Chinese drugs can stimulate the proliferation, differentiation and maturation of cultured osteoblasts *in vitro*.

Key words: kidney-tonifying Chinese drug; cell cultured; osteoblasts; serum pharmacology

骨质疏松症(Os)已成为老年人生活质量下降的主要原因之一,研究有效防治骨质疏松的药物一直受到人类的重视^[1]。我们研究的骨灵丸在临床应用收到了较好的疗效^[2],为了进一步阐明该药的作用机制,我们利用该药的中药血清对体外培养的成骨细胞进行干预,观察细胞的增殖、分化和矿化功能,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

无酚红 DMEM 培养基(Gibco BRL 公司)和胎牛血清(杭州四季青公司),胰酶(美国 Sigma 公司),型胶原酶(美国 Sigma 公司),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(Sigma 公司)。

1.2 成骨细胞的分离与培养

取出生 24 h 的 SD 大鼠的头盖骨(南方医科大学实验动物中心提供),充分剥离骨膜,置盛有 DMEM 培养液的小瓶中修整并剪成 1 mm×1 mm 大小的碎

块。加入 0.1% I 型胶原酶在 37 ℃环境中震荡消化 50 min,加入等体积的胎牛血清以终止消化。收集消化液,在 4 ℃、1 000 r/min 条件下离心 10 min 使细胞沉淀。弃上清液,沉淀细胞放置于含 15%胎牛血清 DMEM 完全培养基和 PEST(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)的培养皿内。并分别以约 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,加入适量培养液,置 37 ℃、95%湿度、5.0% CO₂ 的孵育箱中培养。相差倒置显微镜下密切观察细胞生长状况,每 2~3 d 换新培养液 1 次。细胞长满后传代,使用第 2 代细胞进行实验。

1.3 中药血清的提取

补肾中药由鹿茸、骨碎补等组成,砂锅煎至 300 ml,80 ℃水浴浓缩至 160 ml。设立低(0.5 ml)、中(1.0 ml)、高(2.0 ml)3 个剂量组及空白对照组(生理盐水),每组用 SD 大鼠 4 只,灌胃 3 d,早晚各 1 次。末次灌胃后 1 h 采血,离心,56 ℃水浴 30 min 灭活,-20 ℃冰箱保存备用。

1.4 增殖测定

培养成骨细胞以 6×10^3 孔密度接种于 6 孔塑料培养板,24 h 后换入含 15%中药血清的培养液中,72 h 后用 MTT 方法在酶标仪上进行测试。测试条件参照文献^[3],结果以 D₅₇₀ 表示。

收稿日期:2004-06-23

基金项目:国家自然科学基金(30371840)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30371840)

作者简介:唐井钢(1969-),男,在读硕士研究生,电话:020-61365870

1.5 ALP 测定

加药后 48 h 吸去培养液, 细胞经 0.1% Triton X-100 溶解液破碎制成细胞悬液, 取 0.1 ml 用对硝基苯磷酸盐法测各组 ALP 活性; 另取 0.1 ml 用考马氏亮蓝法测定蛋白含量, 以每 mg 蛋白中国际单位 (U/mg·pro) 表示 ALP 活性。

1.6 矿化结节形成测定

细胞以 2×10^4 密度接种于 12 孔塑料培养板 (直径 24 mm) 中, 2 d 换液 1 次。10 d 后换入含 15% 中药血清的培养液中, 于 14 d 后加入 β -磷酸甘油。用 95% 乙醇原位固定, 0.1% 茜素红染色 30 min。用有格 (0.2 mm \times 0.2 mm) 涤纶薄膜贴附于培养板底部, 低倍光镜下作矿化结节计数。本实验采用双盲法。

1.7 统计学处理

所有结果利用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 组间比较使用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对成骨细胞增殖率的影响

不同浓度的中药血清对培养的成骨细胞均显示增殖刺激作用, 低、中、高剂量组的 A570 值分别为 0.592 ± 0.008 、 0.721 ± 0.022 、 0.627 ± 0.015 , 其中中剂量组的增殖刺激作用较为稳定 (与空白对照组 0.527 ± 0.025 相比 $P < 0.01$), 观察成骨细胞呈梭形、三角形, 形态欠规则, 胞质丰富 (图 1)。各试验组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。



图 1 加入补肾中药血清 48 h 的成骨细胞 (ALP 染色, 原放大倍数: $\times 100$)

Fig.1 Osteoblasts cultured for 48 h in the presence of serum of kidney-tonifying traditional Chinese drug-treated rats (ALP staining, original magnification: $\times 100$)

2.2 对 ALP 表达的影响

不同浓度给药组培养 48 h 后, 低、中、高剂量组的 ALP 活性分别为 0.780 ± 0.029 、 0.876 ± 0.025 、 0.769 ± 0.030 U/mg·pro, 与对照组 (0.737 ± 0.054 U/mg·pro) 相比均呈不同程度提高, 以中剂量组的作用为明显 (与对照组相比 $P < 0.01$), 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 对矿化功能的影响

成骨细胞于培养 14 d 可见矿化结节的形成, 茜素红染色后呈现大小、形态不一的红色阳性结节 (图 2)。低、中、高剂量组的矿化结节数分别为 308.1 ± 18.5 、 340.8 ± 23.4 、 320.3 ± 20.1 , 与对照组的 299.7 ± 20.5 相比分别提高 3.3%~11.4%, 其中中剂量组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

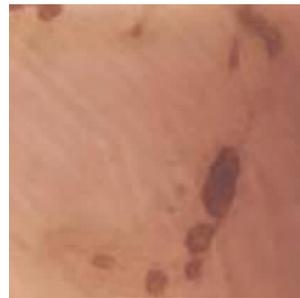


图 2 加入补肾中药血清 14 d 的矿化结节 (茜素红染色, 原放大倍数: $\times 40$)

Fig.2 Mineralized nodules among the osteoblasts treated with the serum for 14 d (Alizarin red staining, original magnification: $\times 40$)

3 讨论

Os 多见于绝经后妇女和老年人, 主要发病机制是骨形成与骨吸收失衡, 即破骨细胞骨吸收功能活跃, 而成骨细胞骨形成功能衰退。应用补肾中药可以改善 Os 患者的临床症状^[4,5]。我们采用中药血清药理学研究方法, 收集达高峰时的血清。此时采集的血清, 应含有该药物的有效成分, 它不仅能反映该药物在体内的真实血药浓度, 而且以此血清进行体外试验, 可排除各种影响的干扰, 结果相对可靠。

加入中药血清后结果显示: (1) 成骨细胞增殖率提高, 观察组的成骨细胞增殖率提高 12.5%~36.8%, 以中浓度的作用较为明显; (2) 成骨细胞 ALP 活性提高 9.2%~18.8%, 以中浓度的表达为明显; (3) 促进矿化结节形成, 观察组的矿化结节数均较对照组增加, 以中浓度组增加明显。ALP 活性的高表达是成骨细胞分化的早期标志^[6,7], 矿化则是细胞进一步分化成熟的功能表现。本实验表明补肾中药除对成骨细胞有刺激增殖作用外, 对 ALP 活性和矿化结节形成也有较好刺激作用。说明在促进细胞增殖的同时, 也能促进细胞进一步分化成熟, 因而可提高成骨细胞骨形成的功能。本实验提示各观察组之间对成骨细胞的作用无明显差异, 但存在一种最适浓度, 中药血清浓度太高, 不适宜细胞增殖、成熟, 太低则起不到作用。

我们已在临床上观察到补肾中药对患者的桡骨密度等方面有较显著的提高, 本实验在细胞水平观察了其其对成骨细胞的直接作用, 说明其防治 Os 的作用机制之一是促进骨形成。

参考文献:

- [1] 朱建民, 方浩, 陈新刚, 等. 降钙素对体外培养成骨细胞的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(2): 147-9.
Zhu JM, Fang H, Chen XG, et al. Effects of calcitonin on osteoblasts

in vitro [J]. Chin J Osteoporos, 2001, 7(2): 147-9.

[2] 李娟, 吴启富, 刘毅, 等. 骨灵丸治疗原发性骨质疏松症的临床疗效观察 [J]. 第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1999, 19(4 Suppl): 47-8.

[3] 朱文菁, 金慰芳, 张丽丽, 等. MTT 法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力 [J]. 上海医科大学学报, 1995, 22(4): 254-7. Zhu WJ, Jin WF, Zhang LL, *et al.* Use of MTT assay for determination of osteoblasts viability and proliferation *in vitro* [J]. J Shanghai Med Univ, 1995, 22(4): 254-7.

[4] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸对抗维甲酸致骨质疏松作用的实验研究 [J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(3): 242-4. Li J, Chen XG, Wu QF, *et al.* Effects of GU LING WAN on

osteoporosis by vitamin A acid: an experimental study [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(3): 242-4.

[5] 李娟, 陈晓光, 吴启富, 等. 骨灵丸防治原发性骨质疏松症的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志 (Chin J Integr Med), 1997, 17(7): 163-4.

[6] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells [J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68(1): 43-52.

[7] Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, *et al.* Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels [J]. Biochem Bioshys Res Commun, 2003, 311(1): 179-86.

(责任编辑:杨金星)

胸骨上下段反向“V”型截骨纠治漏斗胸 2 例报告

Correction of pectus excavatum by reverse “V”-shape cutting in the sternum: report of 2 cases

陈群清, 闫玉生, 童健, 张福伟 (南方医科大学珠江医院心胸外科, 广东 广州 510282)

关键词: 漏斗胸; 纠治术

中图分类号: R655 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)11-1250-01

漏斗胸是儿童最常见的胸廓畸形。近年来我们应用胸骨上下段反向“V”型截骨纠治 2 例漏斗胸收到良好的效果。

1 材料与方法

1.1 病人资料

例 1, 男, 8 岁, 出生后出现前胸凹陷畸形, 逐渐加重, 胸骨下段最明显, 稍剧烈活动即感气促。凹陷处最大储水量 50 ml, 心界明显左偏, 无心脏杂音, 胸片提示胸廓前后径变小, 心影左移, 胸骨柄下段内陷, 诊断为漏斗胸。例 2, 男, 6 岁, 前胸凹陷畸形, 凹陷处最大储水量 35 ml, 心前区可闻及 II 级收缩期杂音, 心脏受压左移, 诊断为漏斗胸。

1.2 手术方法

两患儿手术方式基本相似。患儿气管内全麻, 平卧位取胸骨正中切口, 从第 2 肋至剑突下, 向两侧分离胸大肌至凹陷边缘, 暴露凹陷胸骨及肋软骨, 由于凹陷上缘起自第 3 肋骨水平胸骨, 于此处胸骨前板行“V”型截骨; 距胸骨边缘 1 cm, 于骨膜下分离肋软骨并从内上到外下斜形切断 (第 3~7 肋); 切除剑突, 切断胸骨与腹直肌的连接; 分离胸骨后粘连, 游离畸形段胸骨 (注意保护双侧乳内动静脉), 切断肋间肌; 与胸骨下段凹陷最明显处胸骨后板再做反向“V”型截骨, 将两截骨处以 4 根钢丝上下贯穿固定, 将两侧肋软骨斜形断面内侧端置于外侧端之上, 两断面重叠, 10 号丝线缝合固定, 从而使畸形胸骨上抬并变平整。胸骨下段与腹直肌缝合固定。创面用生理盐水冲洗, 并置胸骨后引流管, 胸骨前以负压球吸引, 两侧胸大肌于正中缝合。术后胸带包扎, 3 个月前胸不负重, 仰卧睡眠。

2 结果

患儿病情恢复良好, 心脏恢复正常位置, 例 2 患儿心脏杂音消失, 无血气胸、无伤口感染等并发症发生。3 个月后随访, 凹陷畸形消失, 无反常呼吸。

3 讨论

漏斗胸的发病原因尚不明确, 可能与胎儿发育障碍、胸骨肋骨发育异常、膈肌异常、呼吸道狭窄、先天性梅毒感染、后天性外伤等有关^[1]。漏斗胸目前治疗方法较多, 但均存在其局限性^[2]。我们采用胸骨上下段反向“V”型截骨纠治漏斗胸, 它有以下优点: (1) 胸骨前板“V”型截骨, 避免了传统的后骨板截骨加自体骨种植, 减少了手术创伤, 效果更加可靠; (2) 加下段胸骨后骨板截骨, 使最凹陷处变平, 较原有手术在外观整形上更加平整、合理; (3) 两侧肋软骨重叠加固, 不强调肋骨的对比, 结合上下两处截骨固定, 这四点固定使整形后的胸骨更加稳定, 无须传统的胸骨金属支撑物, 避免了二次手术取金属支撑物。 (4) 手术操作简单、易行, 适合于各种类型的漏斗胸。

美国目前最流行的术式是微创纠治术, 如 Nuss 法等^[3], 由于其特殊的器械, 国内尚未广泛开展。国内所采用的漏斗胸的纠治方法主要是胸骨抬高术, 在提高漏斗胸纠治效果的同时, 如何减少手术创伤是我们面临的重要课题,

参考文献:

[1] 杨东元, 保阪善昭, 原口和久, 等. 日本和欧美漏斗胸诊疗进展 [J]. 中华整形外科杂志 (J Plast Surg), 2003, 19(2): 142-3.

[2] 李爱武, 张文同, 陈雨历. 漏斗胸的治疗现状与进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2002, 1(3): 203-6.

[3] Nuss D, Kelly RE, Croitoru DP, *et al.* A 10-year review of a minimally invasive technique for correction of Pectus Excavatum [J]. J Pediatr Surg, 1998, 33(4): 545-52.

收稿日期: 2004-05-16

作者简介: 陈群清 (1966-), 男, 博士, 主治医师, 讲师, 电话 020-61643279